

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-508637

(P2000-508637A)

(43) 公表日 平成12年7月11日 (2000.7.11)

(51) Int.Cl.⁷

A 0 1 N 1/02

識別記号

F I

A 0 1 N 1/02

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平9-535835
(86) (22) 出願日 平成9年4月4日 (1997.4.4)
(85) 翻訳文提出日 平成10年10月5日 (1998.10.5)
(86) 国際出願番号 PCT/EP97/01703
(87) 国際公開番号 WO97/37537
(87) 国際公開日 平成9年10月16日 (1997.10.16)
(31) 優先権主張番号 PD96A000084
(32) 優先日 平成8年4月4日 (1996.4.4)
(33) 優先権主張国 イタリア (I T)

(71) 出願人 フィディーア・ソシエタ・ベル・アチオニ
イタリア、イー-35031アバーノ・テルメ、
ヴィア・ボンテ・デッラ・ファブリーカ3
/ア番
(72) 発明者 ボンツィン, ディエゴ
イタリア、イー-35136バドヴァ、ヴィア・
ピオヴェゲット15番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸からなる角膜貯蔵液

(57) 【要約】

6,000,000ダルトン (好ましくは50,000~250,000ダルトン) の平均分子量を持つヒアルロン酸を含む特に2~8℃で角膜組織を貯蔵するための溶液。

【特許請求の範囲】

1. 600,000未満の平均分子量を持つヒアルロン酸または製薬上許容できるその塩を含む角膜貯蔵溶液。
2. さらに平衡電解質溶液と少なくとも1種類の抗生物質とを含む請求項1の角膜貯蔵溶液。
3. 該ヒアルロン酸が50,000～250,000ダルトンの平均分子量を持つ請求項1または2の溶液。
4. ヒアルロン酸が50,000～150,000ダルトンの平均分子量を持つ請求項3の溶液。
5. ヒアルロン酸ナトリウム塩が1～20mg/mlの濃度で存在する請求項4の溶液。
6. ヒアルロン酸ナトリウム塩が0.1～2重量%の濃度で存在する請求項1～5いずれかの溶液。
7. 平衡電解質溶液のpHが7.2～7.4である請求項6の溶液。
8. 抗生物質がゲンタマイシン、ペニシリンGおよびストレプトマイシンからなる群より選択される少なくとも一要素である請求項7の溶液。
9. 角膜組織を請求項1～8いずれかの溶液にさらすことを含む角膜組織貯蔵法。
10. 該医療用溶液が2～8℃の温度に維持される請求項9の方法。
11. 角膜組織を貯蔵するための請求項1～8いずれかの溶液の使用。
12. 角膜組織を2～8℃の温度で貯蔵するための請求項1～8いずれかの使用。

【発明の詳細な説明】**ヒアルロン酸からなる角膜貯蔵液****発明の目的**

本発明の目的は、提供者からの摘出から移植までの間の全層角膜移植用角膜の貯蔵を、ヒアルロン酸を含有する貯蔵液製剤の使用によって改善し、単純化することである。

発明の背景と分野

全層角膜移植は多くの角膜疾患で視力を回復するために広く使用されている。重篤な角膜ジストロフィ、角膜の炎症または角膜変性過程では、全層角膜移植が視力を回復するための唯一の効果的治療法である。この治療法の主な問題点は、提供者からの摘出後に生角膜組織を保存するために使用する方法である。

角膜は、厚さが周辺部で1mm、中央部で0.5mmの明確な構造を持つ無血管組織である。外部環境にさらされる部分は、3～4層の平坦な扁平細胞、1～3層の中間上皮細胞 (mdepidelial cells)、および基底膜とその下にある支質に接着複合体によって結合した単層の円柱基底細胞で形成された層状の非角質化上皮によって覆われている。角膜の貯蔵中に上皮が失われるかもしれないが、基底膜が無傷であれば、移植後の再上皮化は通常迅速である。支質は3つの異なる細胞外マトリックスの層をなしている。これらには上皮から順に、薄いボーマン層、中間の層状支質、およびこの組織の眼房水に面している側面を裏打ちする内皮細胞によって生成される基底膜（デスメ膜）が含まれる。支質のその他の部分は支質線維芽細胞、一般に角膜実質細胞と呼ばれている扁平な細胞によって生産され維持される。

塩類、コラーゲンおよびプロテオグリカンが存在するので、支質は涙と眼房水に対して高張性である。水は上皮側の方が濃度が低く、おそらくこれは上皮層による乾燥のためだと思われる。同様にグルコースも上皮側の方が濃度が低い。なぜならこの代謝物は眼房水から流れ出し、その大部分は上皮によって利用されるからである。支質はプロテオグリカン（デルマタン硫酸とケラタン硫酸）を含有し、前者は上皮側でより濃縮されており、後者は内皮側でより濃縮されている。

角膜内皮は、前眼房から見てデスメ膜の上に並んだ六角形のモザイクを形成する単層の立方内皮である。この六角形細胞は、密着結合（タイトジャンクション）によって互いに連結されているが、それらはその細胞の周囲に完全なシールを形成しているわけではなく、むしろ、それらは細胞頂端膜に集中している。ジャンクションの完全性は周囲の媒質中の Ca^{2+} の存在に依存する。この構造は眼房水とその溶質が傍細胞空間に出入りするのを可能にしている。正常な状態では、体液の流入後も角膜の腫脹は起こらない。等価な体積の体液が内皮のポンピング複合体によって能動的に除去されるからである。 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATP}$ アーゼはこのポンピング系の必須部分であり、したがってこのポンピング系は内皮細胞の代謝活性によって生産されるATPを必要とする。

内皮細胞の機能を完全に評価するには、これらの細胞が眼房水に面する側面に、白血球表面にあるインテグリンLFA-1 (αL , β2) のコレセプターとして機能する免疫グロブリンファミリーの要素、ICAM-1（細胞間接着分子-1）を持つことを観察するのは興味深いことである。ICAM-1はヒアルロン酸のレセプターとしても機能する（McCourt, PAG. ら（1994）J. Biol. Chem. 269, 30081. 30084）。これは、内皮細胞が、眼房水に到達した場合に、白血球と相互作用することを示している。またこれは、正常な状態で白血球の不在下に、内皮層の完全性を保護するためにヒアルロン酸がこのレセプターと結合することをも示しているのかもしれない。

角膜の腫脹：内皮のポンピング機能が失われると、支質の高張性が角膜組織の腫脹を引き起こす。腫脹は角膜厚の増大と透明度の低下をもたらす。さらに、支質から周囲の媒質へのプロテオグリカンの喪失もある。内皮機能の損失は病理学的事象（例：ジストロフィ、変性、緑内障）の結果である。内皮細胞の数は年齢と共に減少（誕生から老齢までに約50%）するから、内皮代償不全は老化によって起こりやすくなる。内皮細胞の再生能は制限されているので、内皮完全性の損傷は、希薄になった残存細胞の腫脹によってしか代償されえない。内皮損傷は移植前の角膜の貯蔵でも主要な危険要素である。この事象は、透明性の喪失と漸進的な内皮細胞死を伴う角膜の腫脹をもたらす。実際、無傷な内皮層の保存は、全

層角膜移植前の角膜保存法を発明する際の主要な目標である。

角膜の貯蔵：提供者から摘出された全眼球は4℃の湿室に保存できるが、24時間以内に使用すべきである。凍結状態での角膜の保存は成功裏に開発されている（Kaufman, H. E. およびCapella J. A. (1968) J. Cryosurg. 1, 125. 129）。細胞内での氷の形成を防止するため、角膜は凍結前に高濃度のDMSOとショ糖で処理される。一定の低温で凍結角膜を取扱い、輸送することの難しさが、この技術の普及を妨げている。別法として、角膜は臓器培養培地中37℃で保存することもできる（Doughman D. J. ら (1976) Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 81, 778-793）。培養培地には細胞が最適に保存されるように血清が添加されるので、この方法には、移植時に角膜によって輸送される残留量の血清に受容者の眼がさらされるという不都合がある。動物の血清は免疫反応を惹起する可能性があり、一方、ヒト血清はウイルス性疾患を伝染させる可能性がある。

現在のところ、最も便利な角膜保存法は、無血清培地中4℃での短期間貯蔵だと思われる。この温度では内皮細胞の代謝活性が最小になり、したがってポンピング機能が失われる。

角膜腫脹は保存培地に保水性化合物を添加することによって防止できる。それらのうち最もよく使用されるものの一つは、単独で（McKarey, B. E. およびKaufman, H. E. (1974) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 13, 165）もしくはグルコサミノグリカン・コンドロイチン硫酸と共に使用される（Kaufman, H. E. ら (1991) Arch. Ophthalmol. 109, 864. 868）腫脹減退化合物デキストランである。しかしコンドロイチン硫酸はそのポリマー内の硫酸分子の分布が多様なので不均質な化合物である（Scott, 1995）。その結果、角膜貯蔵に使用されるその組成物はロット毎に異なることになりうる。また硫酸分子ゆえに、コンドロイチン硫酸は強い負電荷を持っている。

最近、この強い負電荷は、それが角膜内皮の接着能を減少させるので、角膜保存にとって有害であることが示唆された（Chenら, 1996）。さらにコンドロイチン硫酸は、移植前に4℃から室温まで組織を復温すると特に、角膜に浸透し、その腫脹を助けることも報告されている（Kaufmanら, 1991）。コンドロイチン硫

酸が引き起こす角膜腫脹を減少させる試みとして、デキストランなどの腫脹減退剤をコンドロイチン硫酸と組み合わせて含有する角膜保存組成物が調剤された (EP 0 517 972)。しかしデキストランは貯蔵中に支質に浸透し、復温時に膨張圧を増大させる。また、デキストランは角膜にとって老化と変性を誘発する毒性を持ちうることも現在では明らかである (Chenら, 1996)。

Oginoら (Mokugan Zen-shi, Effect of a Newly Developed Corneal Storage Medium on Corneal Endothelium-Morphological Study by Scanning Electron Microscopy (新たに開発された角膜貯蔵培地の角膜内皮に対する作用—走査型電子顕微鏡による形態学的研究), 1995) は、ヒアルロン酸 (HA) を含有する貯蔵培地について記述している。しかしOginoらが使用したヒアルロン酸は800,000の分子量を持っていた。このような高分子量HAは粘稠すぎて貯蔵培地成分としては適当でなく、その溶液の粘度を増大させることなく角膜の腫脹を防止するには、何らかの他の保水成分と組み合わせて使用しなければならない。

したがって本発明の目的は、先行技術の貯蔵液の欠点を回避しつつ生角膜に適した貯蔵条件を与える角膜貯蔵液を提供することである。

発明の詳細な説明

したがって本発明は、ヒアルロン酸からなる角膜液組成物と、低温 (具体的には2~8℃) での生角膜の保存に適したヒアルロン酸からなる製剤の使用に向けられる。本発明は、上述した角膜の構造と機能に関する考察に沿った下記の仮定に基づいている。

(i) 低温での角膜の貯蔵中は、内皮細胞の代謝活性は休止している。したがって栄養素と増殖因子 (血清その他) は必要でない。ポンピング機能は遂行されず、支持を必要としない。

(ii) 角膜の完全性を維持するには、保水性化合物を添加した平衡塩類溶液で十分なはずである。ある単一の保水性化合物が適当であるならば、デキストランのような他の化合物はもはや必要でない。

(iii) 貯蔵中に内皮が損傷されるのを防ぐには、内皮細胞上に保護薄層が必要である。コレセプターICAM-1と結合できる天然リガンドが適当だと思われる。

以下に概説するように、我々はヒアルロン酸が低温で角膜を最適に貯蔵するための必要条件を満たす適当な化合物であることを確認した。

ヒアルロン酸はグリコサミノグリカンの一種である。グリコサミノグリカンには硫酸基を含有する化合物（コンドロイチン、ケラタンおよびヘパラン）も含まれるが、硫酸残基の分布が可変的であるため、これらのグリコサミノグリカンは異なる分子の不均質な集合体である。これとは対照的に、ヒアルロン酸は二糖単位N-アセチルグルコサミンおよびグルクロン酸のみを含有する。したがってヒアルロン酸は明確な一次構造（すなわち数百の二糖単位を含む直鎖と各鎖に固定された数百の陰イオン（カルボン酸基））を持つ均質な化合物である。

最近、ヒアルロン酸に規則正しい二次構造が確認された (Scott, J. E. (1995) Eur. J. Rheumatol. Inflamm. 15, 3-8)。これは糖単位間の多数の水素結合と、二糖単位間の180°のねじれによって生じる2回軸らせん構造によって維持されている。この二次構造により、ヒアルロン酸鎖中に、膜リン脂質または他の脂質と結合しうる約8CH単位（短鎖脂肪酸の長さ）の広範な疎水性部分が生じる。実際、炎症を起した関節におけるヒアルロン酸の有益な作用は、それが血小板活性化因子などの脂質様炎症性サイトカインと結合した結果なのだろう。

水性媒質中の薄いヒアルロン酸濃度（1 μ g/ml以上）では、三次構造が形成される (Scott, J. E. ら (1991) Biochem. J. 274, 699-705)。これは、すべてのヒアルロン酸分子間の動的な接触を樹立するヒアルロン酸鎖の会合によって形成される蜂の巣状の網目構造である。この網目構造は内部に水と溶質を閉じ込めて、それらの外部環境との相互作用を制限する。ヒアルロン酸のレセプターを持つ細胞はそれらを取り巻く広範な網目構造を固定することができる。これは、化学物質がその細胞に接近するのを防止するので、保護効果を持ちうる。ヒアルロン酸鎖の分解を誘発するOH遊離基の作用によって、この構造の緻密さが減少し、また実際にその構造が破壊されうるという観察事実は重要である。要するに、本発明および生角膜を維持するという目的に関係するヒアルロン酸の特性は次の通りである：

1. ヒアルロン酸鎖には、可溶性陽イオン交換体として機能し、したがって一

価または二価陽イオンの角膜組織への移動を制限する、固定された陰イオンが存在すること。

2. ヒアルロン酸の二次構造中には疎水性部分が存在し、それによって、その化合物は細胞膜と接触し、おそらくは細胞膜中の露出している疎水部分を保護できること。

3. 水と溶質を封入し、最大の保水効果を生むヒアルロン酸鎖による網状組織の形成。

4. 内皮細胞の表面にあるICAM-1との相互作用が、それらの細胞自体を取り巻くヒアルロン酸の保護薄層の形成を確実にすること。

原則的に、これらの特性は、低温で内皮細胞を保存し、角膜腫脹を避けるのに十分である。高分子量（1,000,000ダルトン以上）のヒアルロン酸は粘稠な溶液を形成するので、より低分子量のヒアルロン酸を使用すべきである。具体的に述べると、ヒアルロン酸は、約600,000ダルトン未満の平均分子量、好ましくは50,000～250,000ダルトンの範囲内の平均分子量、最も好ましくは50,000～150,000ダルトンの範囲内の平均分子量を持つべきである。その構造は緻密さが低くなりうるものの、この分子サイズでもヒアルロン酸網目構造は形成される。

本発明が包含する医療用溶液については、ヒアルロン酸を数種類の供給源から得ることができる。例えばヒアルロン酸は雄鶏のとさかななどの従来の供給源からEP 0 138 572に記載の方法で精製することができる。また、WO 95/04132に記述されているような発酵法や、WO 95/24497に記述されているようにヒアルロン酸生成酵素を含有する精製タンパク質因子を用いる酵素合成法によって、ヒアルロン酸を得ることもできる。

製剤実施例

本発明で提案される無血清医療用溶液は次の成分を含有すべきである：

1. リン酸塩、重炭酸塩およびヘペス（ヒドロキシエチルピペリジンエタンスルホン酸）でpH7.2～7.4に緩衝処理された平衡塩類溶液。本発明の目的には、最少必須培地（例：Gibco BRL社（メリーランド州）、Sigma社（ミズーリ州）、Flow Laboratories社（メリーランド州）から入手できるようなTC199）で足り

る。この培地は組織培養に広く使用されており、その製剤中に必須の無機塩類、アミノ酸類、ビタミン類およびATP前駆体を含有している。

2. ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、ペニシリンGおよびそれらの組み合わせなどといった（ただしこれらに限らない）、微生物の混入を防ぐための抗生物質。

3. 50,000～150,000ダルトンの分子量を持ち、全溶液に基づいて1～20mg/ml (0.1～2% (wt/vol)) の濃度で添加されるヒアルロン酸ナトリウム塩。

塩類緩衝溶液と抗生物質の選択には変更を施しうる。この単純な組成は、少なくとも1週間は低温で角膜を最適に貯蔵するための必要条件をすべて満たすに十分なはずである。

生物学的評価

1. 材料と方法

ヒアルロン酸ナトリウム塩からなる無血清培地組成物を、デキストランのみ（McKarey-Kaufman）またはコンドロイチン硫酸とデキストラン（Optisol-GS）を含有する市販の角膜貯蔵培地と比較して表1に示す。

一対の人間の移植用提供眼を死後9～10時間以内に摘出した。その眼球から2mmの強膜縁が付いた角膜を単離し、内皮細胞生存性、内皮細胞密度、角膜厚および透明度について調べた。内皮細胞生存性は0.3%トリパンプルーによる染色で評価した。細胞死は通常2つの様式（すなわち摘出中の角膜の機械的圧迫によって生じたしわに対応する染色された細胞の規則正しい配列と、内皮細胞の代謝不全を示す散在性の死）に分類される。この分析は、各実験の最後に、細胞形態と内皮によって覆われていないデスメ膜の領域を評価するためのアリザリンレッド染色を行なうことによって完了した。細胞死は全細胞に対する染色された細胞の百分率として表わした。内皮細胞密度は、10×10mmの方形計数線を装着した光学顕微鏡を使って角膜の中央部分の5視野中の細胞を数えることにより評価した。細胞死が2%未満で内皮細胞数が>2000/mm²の場合は、角膜を移植に適しているとみなした。角膜厚は、表皮と内皮の間の距離を評価するためのデジタルマイクロメーターを装着した直立顕微鏡を使って測定した。各角膜について3つの中間

値を得た。透明度は直立顕微鏡で評価し、次のように等級付けした：等級3，秀；等級2，良（デスメ膜に多少の不整が認められる）；等級1，支質浮腫またはデスメ膜に著しい不整があるので不良。分析後、それ以降の保存試験または全層角膜移植に使用するために、角膜を4℃の貯蔵液に浸漬した。

試験管内試験：これらの実験は、提供者の禁忌または疾患ゆえに移植に適さない保存状態のよい提供角膜を使って行なった。

一対の人間の提供眼を死後10時間以内に摘出した。その眼球から2mmの強膜縁が付いた角膜を単離し、内皮細胞生存性、内皮細胞密度、角膜厚および透明度について調べた。内皮細胞生存性は0.3%トリパンブルーによる染色で評価した。細胞死は通常2つの様式（すなわち摘出中の角膜の機械的圧迫によって生じたしわに対応する染色された細胞の規則正しい配列と、内皮細胞の代謝不全を示す散在性の死）に分類される。この分析は、各実験の最後に、細胞形態と内皮によって覆われていないデスメ膜の領域を評価するためのアリザリンレッド染色を行なうことによって完了した。細胞死は全細胞に対する染色された細胞の百分率として表わした。内皮細胞密度は、10×10mmの方形計数線を装着した光学顕微鏡を使って角膜の中央部分の5視野中の細胞を数えることにより評価した。

10%を超える細胞死と等級1の透明度はこの実験に適さないとみなした。角膜厚は、表皮と内皮の間の距離を評価するためのデジタルマイクロメーターを装着した直立顕微鏡を使って測定した。各角膜について3つの中間値を得た。透明度は直立顕微鏡で評価し、次のように等級付けした：等級3，秀；等級2，良（デスメ膜に多少の不整が認められる）；等級1，支質浮腫またはデスメ膜に著しい不整があるので不良。分析後、角膜を10mlの試験培地（それぞれヒアルロン酸ナトリウム塩、Optisol-GSまたはMcKarey-Kaufman）中、4℃で7～14日間保存した。

臨床試験：非管理化オープンラベル試験を、上述のように評価してヒアルロン酸を含有する培地中で保存した角膜を使って行なった。Optisol-GS培地中で保存した角膜を対照とした。提供者は46～86歳であった。死後2時間から9時間の間に集めた彼らの角膜は、透明度、厚さ、内皮細胞生存性（トリパンブルー陽性

細胞の欠除）および密度（2200～3000細胞/mm²）から判断して、優れた保存状態

にあった。4℃での貯蔵時間は25～96時間だった（表2参照）。角膜は移植時に室温に温められた。円錐角膜、水疱性角膜症、グレノージストロフィ、後天性内皮変性症および角膜白斑のために全層角膜移植を必要とする合計16人の受容者が承認された。術中管理と術後管理は全ての症例で同じとした。移植から2週間後に、再上皮化の程度、角膜の透明度、厚さ（超音波側厚法で測定）および内皮細胞密度（鏡面写真の固定枠分析（fixed-frame analysis）によって評価）を記録した。さらに患者を2ヶ月後に評価した。

2. 結果

試験管内試験：5対の角膜をMcKarey-Kaufman、Optisol-GSまたはヒアルロン酸ナトリウム塩培地中で保存した。透明度、厚さおよび内皮細胞生存性を3日、7日または14日の時点で評価した。その結果を表3に報告する。優れた角膜保存がOptisol-GSとヒアルロン酸培地に観察された。14日後でも内皮細胞の損失は7%を超えなかった。7日目にアリザリンレッドとトリパンブルーによる染色で、内皮細胞の完全性が確認された。同じく角膜の透明度と厚さも良好に保存されていた。対照的に、McKarey-Kaufman培地の有効性は低かった。透明度は3日目には失われ始め、厚さは7日目で最大40%まで増大した。内皮細胞の損失は14日目に22～25%に達した。これらの結果から、角膜保存剤として役立つ傾向がデキストランには乏しいことが確認され、コンドロイチン硫酸とヒアルロン酸ナトリウム塩の方が有効性が高いことが示された。しかしヒアルロン酸ナトリウム塩は、Optisol-GS培地には必要なデキストランが無くても、満足できる角膜保存を達成することができた。上述のように、デキストランは角膜組織に浸透し、復温時に膨張圧を増大させる。

臨床試験：全層角膜移植が予定されていた8人の患者群に、ヒアルロン酸培地中で保存した角膜を移植し、並行する8人の患者群にはOptisol-GS中で保存した角膜を移植した。角膜の再上皮化は術後の3日間で完了した。2週間後、角膜の透明度と厚さは良好に保存されていた。内皮細胞密度の分析を10人の患者で行ったところ、2つの培地の有効性が確認された。2ヶ月後に、移植片はすべて良

好な状態にあり、この時点でそれらは再上皮化と等級3の透明度を示した（表4

)。

結論

我々が行なった試験の結果は、全体として、貯蔵培地中に他の物質が存在しない場合でさえ、ヒアルロン酸が角膜保存に有効な物質であることを立証している。その主な利点は、貯蔵培地にその他の添加を行なわなくても有効だということである。これは、複雑な栄養混合物を避けて培地の組成を簡単かつ安価にする。さらに、ペプチドやタンパク質（増殖因子類）などの不安定な成分を含まないので、貯蔵時の培地の安定性が増大し、分解産物の形成が防止される。ヒアルロン酸培地のさらなる利点は、外科的処置時に薄い組織を保存することである。これは組織の状態の正確な評価と移植中のより容易な取扱いを可能にする。

このように本発明を説明したので、これに様々な変更を加えることは明らかだろう。そのような変更は本発明の思想と範囲からの逸脱であるとみなされるべきではなく、当業者には明らかであろうが、それらの変法はすべて下記の請求の範囲に包含されると解される。

表1: ヒアルロン酸ナトリウム塩を含有する培地の特徴 (MK および OPTISOL GS® との比較)

液の成分	MK	Optisol GS®	ヒアルロン酸ナトリウム塩含有培地
培地	TC199	TC199	TC199
緩衝液	ヘース 25mM	イーグル BSS MEM	ヘース 25mM
重炭酸ナトリウム	0.35g/L	ヘース 25mM	0.35g/L
抗生物質	ゲンタマイシン 100 µg/ml	不明	ゲンタマイシン 10 µg/ml
	—	ゲンタマイシン 200 µg/ml	ゲンタマイシン 10 µg/ml
	—	ストレプトマイシン 200 µg/ml	ストレプトマイシン 200 µg/ml
ヒアルロン酸ナトリウム塩	—	—	2%
pH	7.2~7.4	7.2~7.4	7.2~7.4
オスモル濃度	310~330 mOsm/Kg	320 mOsm/Kg	330 mOsm/Kg

1) デキストランからなる McKaery-Kaufman 溶液

表2: 全層角膜移植 - 提供者の特徴

提供者番号	年齢 (歳)	性別	死因	外植までの時間経過 (時間/分)	内皮密度 (細胞/mm ²)
1	79	女	心血管疾患	4.20	2700
2	52	女	心血管疾患	9.10	2600
3	61	女	腫瘍	3.10	2200
4	50	男	心血管疾患	2.10	2800
5	86	男	腫瘍	2.10	2600
6	46	女	腫瘍	2.00	3000
7	85	女	心血管疾患	5.10	2400
8	55	女	心血管疾患	3.30	2500

表3 : 試験管内実験の結果
 MK, OPTISOLGS (OPT) およびヒアルロン酸ナトリウム塩含有培地 (HA) 中に保存した一對のヒト角膜
 0, 3, 7 および 14 日時点の分析

支 質 内 皮																			
角膜	提供者年 齡 (歳)	死亡外植 時間経過	内皮密度 (細胞/mm ²)	透明度				平均厚 (μ m)				平均心臓死亡率 (%)				平均散在性死亡率 (%)			
				0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
1-MK	45	5.00	2100	3	2	1	-	488	520	668	-	1	4	14	-	1	3	9	-
1-OPT				3	3	3	-	500	481	487	-	1	3	5	-	1	1	2	-
2-MK	89	5.00	1820	2	2	1	-	550	589	608	-	2	3	7	-	0	3	5	-
2-HA				2	2	2	-	507	494	494	-	2	2	2	-	0	0	2	-
3-MK	58	11.30	1600	2	-	-	1	485	-	-	685	5	-	-	22	0.5	-	-	25
3-HA				2	-	-	2	464	-	-	380	5	-	7	0.5	-	-	1	-
4-OPT	81	10.00	2400	3	-	2	-	475	-	475	-	7	-	8	-	0	-	1	-
4-HA				3	-	2	-	600	-	469	-	2	-	3	-	0	-	1	-
5-OPT	58	11.00	2500	3	-	-	2	510	-	-	440	3	-	-	6	0	-	-	3
5-HA				3	-	-	2	488	-	-	450	1	-	5	0	-	-	2	-

表4：全層角膜移植の結果
 OPTISOL GS®またはヒアルロン酸ナトリウム塩に基づく培地中で保存した一対のヒト角膜
 NT=未決定

番号	年齢 (歳)	性別	角膜疾患	貯蔵期間 (時間)	移植片の直径 (mm)	手術後 の日数	再上皮化	透明度	側厚値 (μ m)	内皮細胞密度 (細胞/mm ²)
1-HA	51	男	グレノー変性症	47	8.0~8.2	14	2	2	540	2000
1-OPT	28	女	円錐角膜	47	7.5~7.7	15	3	2	560	2000
2-HA	50	女	ヘルペス後白斑	26	8.0~8.2	16	3	3	550	2100
2-OPT	36	男	ヘルペス後白斑	25	8.0~8.2	16	2	3	560	2250
3-HA	70	男	後天性内皮変性症	71	8.0~8.2	16	3	2	500	1220
3-OPT	87	男	水疱性角膜症	168	7.5~8.0	16	3	2	520	ND
4-HA	66	男	外傷後白斑	96	9.1~9.5	13	2	2	566	2100
4-OPT	43	男	円錐角膜	96	8.0~8.2	13	3	2	550	ND
5-HA	26	女	円錐角膜	72	7.5~7.7	12	3	3	545	ND
5-OPT	46	女	円錐角膜	72	8.0~8.2	13	3	3	520	ND
6-HA	48	女	円錐角膜	72	8.0~8.2	10	3	3	533	ND
6-OPT	25	男	円錐角膜	72	9.1~9.5	10	3	3	558	ND
7-HA	32	男	円錐角膜	40	7.5~7.7	10	3	3	528	1200
7-OPT	51	女	円錐角膜	40	7.5~7.7	10	3	3	555	1800
8-HA	57	男	血管化白斑	96	7.6~8.0	14	3	2	610	2400
8-OPT	69	男	水疱性角膜症	96	8.6~9.0	13	3	1	633	2200

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No PCT/EP 97/01703		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A01N1/02 A61K31/725		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORTSCHR. OPHTHALMOL.. vol. 88, no. 2, April 1991. pages 113-117, XP002036192 M. BÖHNKE, M. HAGENAH & J. DRAEGER: "New osmotic additives to culture media for cornea preservation." see the whole document ---	1-12
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9420 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-163841 XP002036193 & JP 06 107 538 A (SHISEIDO CO LTD) , 19 April 1994 see abstract --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July 1997		Date of mailing of the international search report 18.08.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klaver, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/01703

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 197 718 A (FIDIA SPA) 15 October 1986 see examples V,VI; tables 6,7 ---	1-8
A	EP 0 138 572 A (FIDIA SPA) 24 April 1985 cited in the application see the whole document ---	1-12
A	EP 0 517 972 A (LINDSTROM RICHARD L ;SKELNIK DEBRA L (US)) 16 December 1992 cited in the application see column 7, line 11-19; claims 1-4 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/01703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0197718 A	15-10-86	AU 592077 B	04-01-90
		BE 904547 A	03-10-86
		CH 672886 A	15-01-90
		DE 3689384 D	27-01-94
		DE 3689384 T	07-07-94
		EP 0555898 A	18-08-93
		FR 2579895 A	10-10-86
		IE 64440 B	09-08-95
		IN 169540 A	09-11-91
		IN 165867 A	03-02-90
		JP 2585216 B	26-02-97
		JP 61236732 A	22-10-86
		LU 86386 A	02-09-86
		NO 174277 B	03-01-94
		US 5631241 A	20-05-97
		US 5166331 A	24-11-92
		US 4736024 A	05-04-88
		US 5442053 A	15-08-95
		HU 208833 B	28-01-94
EP 0138572 A	24-04-85	AR 231992 A	30-04-85
		AU 3414884 A	18-04-85
		BE 900810 A	11-04-85
		CA 1205031 A	27-05-86
		CH 666897 A	31-08-88
		DK 171029 B	22-04-96
		FR 2553099 A	12-04-85
		HK 66091 A	30-08-91
		IN 163192 A	20-08-88
		LU 85582 A	04-06-85
		US 5631241 A	20-05-97
		US 5166331 A	24-11-92
		US 5442053 A	15-08-95
		JP 8259604 A	08-10-96
		JP 6008323 B	02-02-94
		JP 61028503 A	08-02-86
EP 0517972 A	16-12-92	US 5104787 A	14-04-92
		CA 2041828 A	04-11-92
		US 5407669 A	18-04-95

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.